

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005601

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US
Number: 60/604,704
Filing date: 27 August 2004 (27.08.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 June 2005 (16.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24. 5. 2005

PA 1294618

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

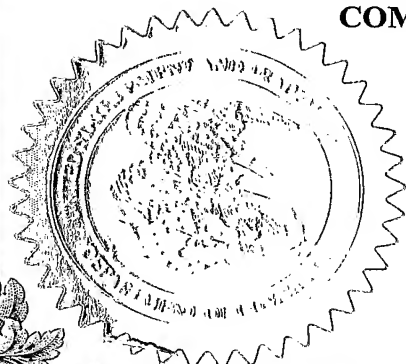
March 11, 2005

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

APPLICATION NUMBER: 60/604,704

FILING DATE: August 27, 2004

**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



Trudie Wallace
TRUDIE WALLACE
Certifying Officer

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

INVENTOR(S)			
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)	
Yukihiko MASHIMA		Tokyo	Japan
<input type="checkbox"/> Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheet(s) attached hereto			
TITLE OF THE INVENTION (500 characters max) METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC NEUROPATHY			
CORRESPONDENCE ADDRESS <i>Direct all correspondence to the address for SUGHRUE MION, PLLC filed under the Customer Number listed below:</i> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> WASHINGTON OFFICE 23373 CUSTOMER NUMBER </div>			
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)			
<input checked="" type="checkbox"/> Specification	Number of Pages	<input type="checkbox"/> seventy-seven (77) <input checked="" type="checkbox"/> three (3) and twenty-two (22) sheets of tables	<input type="checkbox"/> CD(s), Number _____ <input type="checkbox"/> Other (Tables) _____
<input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s)	Number of Sheets	<input type="checkbox"/> Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76	
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT			
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27. <input checked="" type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fees. The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880 . Please also credit any overpayments to said Deposit Account. <input type="checkbox"/> The USPTO is hereby authorized to charge the Provisional filing fees to our Deposit Account No. 19-4880 . The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880 . Please also credit any overpayments to said Deposit Account.			<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 100px; margin: 0 auto;"> FILING FEE AMOUNT (\$) \$160.00 </div>
The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.			
<input checked="" type="checkbox"/> No. <input type="checkbox"/> Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____			

Respectfully submitted,

SIGNATURE

Bruce E. Kramer / by agent
No. 33,276
DATE August 27, 2004

TYPED or PRINTED NAME

Bruce E. KramerREGISTRATION NO. 33,725TELEPHONE NO. (202) 293-7060DOCKET NO. P83334**USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT**

DESCRIPTION

METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC NEUROPATHY

5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a method and kit for diagnosis of optic neuropathy.

BACKGROUND ART

10 Glaucoma is a major cause of blindness worldwide, and estimated approximately 67 million persons suffered from some form of glaucoma. The majority of cases occur as late adult onset (typically over age 40 years) of primary open-angle glaucoma (POAG), which is the most common form of glaucoma and affects approximately 2% in white population and 7% of black
15 population over 40 years old. POAG results in a characteristic visual field changes corresponding to the excavation of the optic disc that is usually associated with an elevation of intraocular pressure (IOP). Normal-tension glaucoma (NTG) is a form of open-angle glaucoma in which typical glaucomatous
20 cupping of the optic nerve head and visual field loss are present but in which there is no evidence of increased IOP over 21 mm Hg at all times. In Japan, prevalence of glaucoma is approximately 3.5 % over 40 years old: POAG 0.58 % and NTG 2.04 %. Prevalence of NTG in Japanese population is high compared with
25 that in other populations. Glaucoma is a multifactorial

disorder characterized by a progressive optic neuropathy associated with a specific visual field loss, and results from the interaction of multiple genes and environmental influences, although intraocular pressure (IOP) is a major risk factor for glaucoma.

Risk factors to develop glaucoma include high IOP, age, race, positive family history, myopia, the presence of diabetes or hypertension, and genetic factors. Although the exact pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy is remains unclear, it is generally accepted that an increased IOP is a major risk factor. Current treatment for glaucoma consists of interventions which lower IOP. However, in some patients with glaucoma, NTG or advanced stage of POAG, reduction of IOP does not prevent the progression of the disease, indicating that factors other than an increased IOP may be involved in the development or progress of glaucoma.

POAG and NTG are a heterogeneous group of conditions probably with different multi-factorial etiologies resulting in the observed patterns of neuronal loss in the optic disk.

The association between glaucoma and the presence of many systemic vascular diseases including low systemic blood pressure, nocturnal dips in blood pressure, hypertension, migraine, vasospasm, and diabetes has been reported. The presence of optic disc hemorrhages in NTG patients suggests that vascular insufficiencies are deeply involved in the

development and progression of NTG. A high percentage of patients with POAG receive a wide variety of medications for coexisting disorder. Especially, systemic hypertension was the most common disorder, occurring in 48% of the total population.

Glaucoma-like morphological changes have been reported in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) at the atrophic stage and dominant optic atrophy (DAO). Recently, the inventor has reported optic disc excavation by a quantitative analysis using Heidelberg retinal tomography (HRT) in the atrophic stage of Japanese 15 patients with LHON harboring the 11778 mutation. LHON is a maternally-transmitted eye disease that mainly affects young adult men. Approximately 70% of patients were male. This disease usually causes severe and permanent loss of vision resulting in a visual acuity of less than 0.1. Visual field defects are present as central or cecocentral scotomas. So far more than 20 point mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) have been reported in LHON patients worldwide, and more than 80% of LHON patients carry one of three mtDNA mutations at nucleotide position 3460, 11778, or 14484.

The major difference among LHON patients with one of these mtDNA mutations is in the clinical course. The 3460 and 14484 mutations are associated with better visual prognosis than the 11778 mutation which shows visual recovery rates of

only 4% to 7%. However, visual recovery has been documented in some patients with the 11778 mutation and an age of onset in the low teens. Recovery of vision appears to be more likely when visual deterioration begins at an early age, even in patients with the 11778 mutation.

The clinical variability of LHON patients, which includes age at onset, male predilection, incomplete penetrance, and visual recovery, suggests that the disease most likely results from polygenic or multifactorial mechanisms, possibly involving environmental stressors, X-chromosomal loci, and other mtDNA mutations. However, attempts to identify a relevant locus on the X-chromosome have not been successful. So-called "secondary LHON mutations" are more frequently found in European LHON patients than in unaffected Europeans and are polymorphisms linked to the European haplotype J. These polymorphisms are not strong autonomous risk factors.

Thus, the primary mutations are the major risk factors in LHON, but additional etiologic factors that augment or modulate the pathogenic phenotypes appear to be necessary. Considerable evidence indicates that heavy alcohol and/or tobacco use increases the risk of optic neuropathy in LHON families, although one study did not find this association. Possible secondary genetic interactions are complex and not firmly established.

【発明の開示】

本発明者は、視神経症、特に緑内障およびレーベル病を発症する危険因子を検出可能な危険遺伝子を鋭意検討の結果、視神経症の発症との関連性の高いいくつかの遺伝子多型を見出した。

5 即ち、本発明は、生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程を含む、生体試料の遺伝子多型の検出方法に関する。

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

10 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損

15 (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

20 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

(8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子：コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

25 (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

- (11) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (12) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号 713 位がチ
5 ミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号 521 位がシ
トシンまたはチミン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシ
トシンまたはアデニン
- 10 (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニ
ンまたはアデニン
- (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 385 位がシトシ
ンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子：塩基番号 102 位がチミンま
15 たはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子：コドン番号 23 位がシチジ
ンまたはセリン
- (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- 20 (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子：塩基番号 190
位がグアニンまたはシトシン
- (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子：塩基番号 677
位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子：コドン番号 192 位がグリシン
25 またはアルギニン

- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 54 位がロイシンまたはメチオニン
- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- 5 (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- 10 (31) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- (32) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- 15 (33) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン
- (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- 20 (36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- (37) SELE (E-セレクトイン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン
- 25 (38) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(39) ミクロゾーム型エポキシヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

また、本発明は、以下の工程 [I] から [III] を含む、視神経症の診断方法に関する。

5 [I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1 つを解析する工程

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

10 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損

(4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

15 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

20 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

(8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子：コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

25 (11) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

- (12) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- 5 (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- 10 (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子：塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- 15 (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子：コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$) 遺伝子多型
- (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子：塩基番号 190
- 20 位がグアニンまたはシトシン
- (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子：塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子：コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- 25 (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子：塩基番号 54 位がロイシンまたは

メチオニン

(27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン

5 (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G

(29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン

(30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

10 (31) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン

(32) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

15 (33) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(34) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

(35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

20 (36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

(38) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

25 (39) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号

113 位がチロシンまたはヒスチジン

〔 I I 〕前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を決定する工程、および

〔 I I I 〕決定された遺伝子型から視神経症の遺伝的リスクを求める工程。

- 5 本発明は、特に前記工程〔 I 〕において（ 1 ）～（ 3 7 ）のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴とする緑内障の診断方法、または（ 3 8 ）～（ 3 9 ）のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴とするレーベル病の診断方法に関する。

【発明の実施形態】

- 10 本発明において、「C9099A」等の表記は、遺伝子の塩基置換（ヌクレオチド置換）を示し、具体的には遺伝子の塩基番号 9099 位のシトシン（C）がアデニン（A）に変異していることを意味する。またこれは、塩基番号 9099 位にシトシン（C）またはアデニン（A）を有する遺伝子多型が存在することを示すものでもある。
- 15 本発明において、「Gln192Arg」等の表記は、遺伝子の塩基置換に伴うアミノ酸置換を示し、具体的にはタンパクのコードン番号（アミノ酸番号）192 位のグリシン（Gln）がアルギニン（Arg）に変異していることを意味する。またはこれは、コードン番号 192 位にグリシン（Gln）またはアルギニン（Arg）を有するタンパク多型が存在することを示すものでもある。
- 20 本発明において、「遺伝子多型」とは、遺伝子中のある部位において、ヒトによって 2 種以上の塩基が存在することをいい、いわゆる単一ヌクレオチド多型（single nucleotide polymorphism: SNP）および複数ヌクレオチドからなる配列にわたる多型の両方を含む。遺伝子多型は遺伝子の発現や活性における変化を結果として生じないものであっても、あるいは遺伝子の発現や活性に
- 25 おける変化を結果として生じるものであっても良い。また、遺伝子の塩基配列

が野生型（正常遺伝子の塩基配列）には存在しない場合、遺伝子変異というが、
遺伝子変異も本発明の遺伝子多型に含まれる。

本発明において、遺伝子多型の検出は、遺伝子多型ごとに、または複数もしくは全部同時に行ってもよい。また、検出に用いられる遺伝子多型は、本発明
5 にて視神経症との関連が新規に見出された遺伝子多型に加えて、従来から視神経症との関連が知られている公知の遺伝子多型を含めて行ってもよい。複数の遺伝子多型を用いることで、視神経症の診断確率をより高めることが可能となる。

本発明において、遺伝子多型を検出する方法は特に限定されるものでなく、
10 通常公知の方法を用いることができる。代表的な検出方法としては、PCR-RFLP法（制限酵素切断断片長多型解析）、PCR-SSCP法（一本鎖DNA高次構造多型解析）、ASOハイブリダイゼーション法、ダイレクトシーケンシング法、ARMS法、DGGE法、RNAse A切断法、化学切断法、DPL法、TaqMan-PCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、TD
15 I法、一塩基伸長法、WAVE法、一分子蛍光検出法などが挙げられる。本発明の方法においては、これらの検出方法は単独で用いても、任意に組み合わせて用いてもよい。

本発明において、遺伝子多型の検出に供される生体試料は特に限定されるものではなく、例えば、毛髪、血液、唾液、リンパ液、気道粘液、培養細胞、尿
20 などから得ることができる。

本発明において、「診断」とは、発症の診断のみならず、発症を早める危険因子および病態を進行させる危険因子の診断も含まれる。

本発明は、本発明の検出方法または診断方法に使用されるキット（遺伝子あるいはタンパク多型検出用キット、または視神経症診断用キット）を提供する。

25 該キットには、先述の（１）～（３９）の多型からなるグループより選択され

る一つ以上の遺伝子多型を検出または解析するための遺伝子プライマーやプローブ、またはタンパク多型を検出または解析するための抗体などが含まれる。

本発明において、「プライマー」とは、ヌクレオチドの複製を行う際必要な、複製開始点となる相補的ヌクレオチド断片を意味し、「プローブ」とは、組換え DNA 実験で目的遺伝子を探り出すための DNA、RNA の断片を意味する。プライマーまたはプローブは、目的の遺伝子多型が存在する部位またはその周辺の配列に特異性を有するものであって、他の遺伝子と同じでなければ(例えば、繰り返し配列やパリンドローム配列でないことなどが必要)特に制限されず、DNA 合成の態様、合成する DNA の領域および塩基長などに応じて適宜選択することができる。本発明のプライマーまたはプローブは、DNA 自動合成等の公知の方法を利用して本発明で開示する塩基配列に従って合成することができる。

【発明の効果】

本発明によれば、視神経症(特に緑内障、レーベル病など)に関連する遺伝子多型が解析され、生体試料の遺伝子型が検出される。この遺伝子型の検出によって得られる多型情報を用いることにより、該疾患のリスク診断を行うことが可能となる。

また、視神経症と関連の高いいくつかの遺伝子多型を用いた解析を組み合わせることによって、信頼性が高く、高精度で予知確率の高いリスク診断することが可能となる。

例えば、開放隅角緑内障の原因遺伝子として、現在ミオシリン、オプチニューリンの遺伝子変異の2つが明らかになっているが、他にも4つ染色体上にその存在が知られている。これら公知の変異遺伝子と本発明で緑内障との関連が明らかとなった遺伝子多型(変異を含む)を持てば、ほぼ100%緑内障を発症することが予測されるので、発症前診断として有効である。

さらに、人種や性別において視神経症との関連性が認められたSNPについては、その遺伝子多型を単独で解析することによっても、極めて高い確率でリスク診断することが可能となる。

また、得られた遺伝子多型情報に基づき、統計学的な解析を行うことによつて、発症年齢の予測、生活習慣病の関与の予測、症候因子の関与の予測、点眼剤や内服剤の反応性の予測を行うことが可能となる。したがって、発症前診断による早期発見により、危険因子の除去（生活、環境改善の改善の指導）および早期治療（変異遺伝子の除去、遺伝子に基づく適切な治療の開始）などを行うことが可能となり、患者の症状に応じたオーダーメイド医療によって失明率を低下することが可能となる。

早期治療としては、例えば、本発明の診断方法を実施した結果、解析対象の多型が視神経症の発症リスクを高める遺伝子型であった場合に、発症リスクの低い遺伝子型を有する遺伝子を生体内に導入して発現させれば、当該遺伝子が発現することによって症状の軽減、発症の抑制、発症リスクの軽減などを期待できる。また、発症リスクの高い遺伝子型を有する遺伝子のmRNAに対するアンチセンス鎖を導入するか、RNAi法を用いることによって、当該mRNAの発現を抑制する方法によっても、同様の治療効果が期待される。

また、原因遺伝子がどのように視神経症の発症に関与しているかの解析により、視神経症の原因解明が可能となり、病態生理に基づいた新たな治療薬の開発が可能となる。

さらに、本発明の診断対象である視神経症の遺伝子多型情報と内科領域で行われると考えられる生活習慣病の疾患遺伝子多型情報を組み合わせることによって、総合的な内科診断を、生活習慣病や高齢者の加齢に伴う疾患の総合的なリスク診断に役立てることが可能になり、質の高いQOL (Quality of life) に役立てることが可能となる。

以下、本発明を試験例によりさらに詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

**EXAMPLE 1 Polymorphic Variants of Genes Associated with
5 Apoptosis and Oxidative Stress in Leber's Hereditary Optic
Neuropathy**

Purpose: To determine whether genetic polymorphisms for
oxidative stress and apoptosis cause the clinical variability
10 in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON).

MATERIALS AND METHODS

Patients

We studied 86 unrelated Japanese patients with LHON
carrying the 11778 mutation with homoplasmy. Their mtDNA
15 mutation was confirmed by polymerase chain reaction followed
by a restriction-enzyme assay which revealed concordant gain
of an MaeIII site.

The mean age at the onset of visual loss in 86 LHON
patients was 25.1 ± 13.0 years with a range 3 to 65 years.

20 Genomic DNA Extraction and Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by
the SDS-proteinase K and phenol/chloroform extraction method.
Polymorphisms were examined in the oxidative stress-related
gene, microsomal epoxide hydrolase (EPHX1), and the
25 apoptosis-related gene, TP53.

Each polymorphism was identified using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques (Table 1).

5 Table 1. Primer sequences, product size, and annealing temperatures

Gene		Primer sequences	Product Size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Restriction Enzyme
TP53	F	TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA	199	60.0	Acc II
	R	TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC			
EPHX1	F	GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C	165	56.0	EcoR V
	R	TCA ATC TTA GTC TTG AAG TGA GGA T			

10 RESULTS

The associations between age at onset and the polymorphisms were presented in Table 2-1 and Table 2-2.

Table 2-1. Association between age at onset and TP53 (Arg72Pro) and EPHX1

15 (Tyr113His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

Gene	Genotype		P
TP53 (Arg72Pro)	Arg/Arg	Arg/Pro + Pro/Pro	0.009
Age at onset	20.7±10.6 (n=35)	28.1±13.8 (n=51)	
EPHX1 (Tyr113His)	Tyr/Tyr + Tyr/His	His/His	0.038
Age at onset	27.9±13.9 (n=45)	22.1±11.4 (n=41)	

P Value for t-test

Table 2-2. Association between age at onset and TP53 (Arg/Arg) and EPHX1

20 (His/His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

Group 1	Group 2	Group 3	P
Arg/Arg and His/His	Arg/Arg or His/His	others	0.0044
17.7±9.3 (n=19)	25.3±11.3 (n=38)	29.8±15.1 (n=29)	

P value for Kruskal-Wallis

Group 1: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 and His/His at codon

25 113 in EPHX1.

Group 2: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 but not His/His at codon 113 in EPHX1, or His/His at codon 113 in EPHX1 but not Arg/Arg at codon 72 in TP53

Group 3: Patients other than Groups 1 and 2

5

As shown in Table 2-1, the codon 72 genotype in TP53 and the codon 113 genotype in EPHX1 were significantly associated with younger age at onset of Leber's hereditary optic neuropathy.

10

As shown in Table 2-2, the co-existence of the Codon 72 genotype in TP53 and the codon 113 genotype in EPHX1 were significantly associated with younger age at onset of Leber's hereditary optic neuropathy.

15

These results indicated that detection of the Arg/Arg homozygote in TP53 and His/His homozygote in EPHX1 make possible the early diagnosis and early treatment of Leber's hereditary optic neuropathy.

20

These results also indicated that the Codon 72 polymorphism may interact with mitochondrial dysfunction to influence disease expression. Individual variations may exist in the apoptotic response that is correlated with the polymorphism at codon 72 of p53. Bonafe et al (Biochem Biophys Res Commun 2002;299:539-541.) reported that cultured cells from healthy subjects carrying the Arg/Arg genotype underwent more extensive apoptosis than cells from Arg/Pro subjects in

25

response to the cytotoxic drug cytosine arabinoside. Thus, naturally occurring genetic variability at the p53 gene could partly explain individual differences in *in vivo* susceptibility of cells to a chemotherapeutic drug. Dumount et al (Nat Genet 2003;33:357-365). reported that the Arg72 variant was more efficient than the Pro72 variant at inducing apoptosis, with at least one mechanism underlying this greater efficiency being enhanced localization of Arg72 variant to mitochondria in tumor cells. The synthetic p53 inhibitors might be highly effective in treating LHON in which neurons died by apoptosis triggered by mitochondrial impairment and oxidative stress.

Example 2 Mitochondrial DNA mutations related with Leber's hereditary optic neuropathy in primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma.

Materials and Methods

Patients

A total of 651 blood samples were collected at seven institutions in Japan. There were 201 POAG patients, 232 NTG patients, and 218 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study.

The mean age at the time of examination was 61.2 ± 16.0 years in POAG, 58.8 ± 13.6 years in NTG, and 70.6 ± 10.9 years

in the control subjects. The mean age of the control subjects was significantly older than that of POAG patients ($P < 0.001$) and the NTG patients ($P < 0.001$). We purposely selected older control subjects to reduce the probability that a subset of them would eventually develop glaucoma. There were 112 (55.7%) men in the POAG group, 108 (46.6%) in the NTG group, and 89 (40.8%) in the control group.

Patients were considered to have POAG if they had a normal open-angle, a cup-disc ratio greater than 0.7 with typical glaucomatous visual field loss on either Goldmann or Humphrey perimetry, and the absence of ocular, rhinologic, neurological, or systemic disorders which might be responsible for the optic nerve damage. Patients with NTG had an IOP of 21 mmHg or lower. Patients with exfoliative glaucoma, pigmentary glaucoma, and corticosteroid-induced glaucoma were excluded.

Two-hundred-eighteen control samples were obtained from Japanese subjects who had no known eye abnormalities except for cataracts. These subjects were older than 40 years, had IOPs below 21 mm Hg, had normal optic discs, and no family history of glaucoma.

Detection of mtDNA Mutations by Invader® Assay

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods of phenol-chloroform extraction.

The primary probes (wild and mutant probes) and Invader[®] oligonucleotides (Invader[®] probe) used to detect the six mtDNA mutations (G3460A, T9101C, G9804A, G11778A, T14484C, and T14498C) by the Invader[®] assay are shown in Table 3.

5

Table 3 The oligonucleotide sequence of wild type, mutant, and Invader probes with Invader assay to detect mutations of mtDNA

Nucleotide	Target	Probe	Sequence	Tm	Dye
G3460A	Anti-sense	Wild	ACGGACGGGGAGgcataaaaactcttcacca	63.2	RED
		Mutant	CGGGGGGAGaccataaaaactcttcacaaaa	63.3	FAM
		Invader	ccctacgggctactacaaccccttcgctgact	77.7	
T9101C	sense	Wild	CGGGGGGAGgataagtgtagagggaagg	64.1	FAM
		Mutant	ACGGACGGGGAGtgataagtgtagagggaag	62.2	RED
		Invader	ggcgacagcgatttctagtgatgcagtagaattagaattgtgaagt	76.8	
G9804A	anti-sense	Wild	ACGGACGGGGAGgccacaggttcca	63.7	FAM
		Mutant	CGGGGGGAGgacacaggttccac	63.7	RED
		Invader	catttcgacggcatctcaggtcacaatttttggat	76.7	
G11778A	Anti-sense	Wild	ACGGACGGGGAGgcataaatcctctctcaag	63.5	RED
		Mutant	CGGGGGGAGgacataaatcctctctcaag	62.2	FAM
		Invader	gcctagcaaaactcaaaactacgaacgcactcactct	77.7	
T14484C	Sense	Wild	CGGGGGGAGatggttgcctttggatatactag	63.4	FAM
		Mutant	ACGGACGGGGAGgtggttgcctttggatatacta	62.8	RED
		Invader	ttttgggggaggttatatgggtttaatagtttttttaattatttaggggaatgt	76.0	
T14498C	sense	Wild	CGGGGGGAGcatttaggggaatgatggt	64.0	FAM
		Mutant	ACGGACGGGGAGgttttaggggaatgatgg	62.7	RED
		Invader	tggtattattctgaatttttggggaggttatatgggtttaatagtttttttaatttt	74.1	

15

Invader[®] assay FRET-detection 256-well plates (Third Wave Technologies, Inc, Madison, WI) contains the generic components of an Invader[®] assay (Cleavase[®] enzyme VIII, FRET probes, MOPS buffer, and polyethylene glycol) dried in each of the individual wells. The biplex format of the Invader[®] assay enabled simultaneous detection of two DNA sequences in a single well.

20

The detail method was described previously. In brief, 8 µl of the primary probe/Invader[®]/mixture and total DNA (10

25

ng) samples were added to each well of a 96-well plate, and were denatured by incubation at 95° C for 10 min. After 15 µl of mineral oil (Sigma, St. Louis, MO) was overlaid on all reaction wells, the plate was incubated isothermally at 63° C for 2 hours in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) and then kept at 4° C until fluorescence measurements. The fluorescence intensities were measured on a CytoFlour 4000 fluorescence plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA) with excitation at 485 nm/20 nm (wavelength/ bandwidth) and emission at 530 nm/25 nm for FAM dye; excitation at 560 nm/20 nm and emission at 620 nm/40 nm for Redmond RED (RED) dye. Each samples was tested in duplicate in the same plate and two fluorescence measurements were performed in each plate. Thus, four measurements were obtained for each sample and they were averaged.

Direct DNA Sequencing

To detect mutations by direct sequencing, the PCR products were first purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) to remove unreacted primers and precursors. The sequencing reactions were then performed using the ABI PRISM BigDye Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The data were collected by the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by the ABI PRISM sequencing analysis program (v.3.7).

Table 4. Primer sequences

mutation		Primer Sequences (5' to 3')	
5	3460	F	CAG TCA GAG GTT CAA TTC CTC
		R	TGG GGA GGG GGG TTC ATA GTA
	11778	F	GGC GCA GTC ATT CTC ATA AT
		R	AAG TAG GAG AGT GAT ATT TG
	14484	F	無し
5		R	GCT TTG TTT CTG TTG AGT GT
	9101	F	AAA ATG CCC TAG CCC ACT TC
		R	GTC ATT ATG TGT TGT CGT GC
	9804	F	CAC ATC CGT ATT ACT CGC AT
		R	CGG ATG AAG CAG ATA GTG AG

RESULTS

A total of 651 Japanese subjects were studied. When a nucleotide substitution is located within a primary probe or an invader probe, the examined cases showed no reaction to both probes by Invader assay. In such cases, direct sequence analysis showed single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the nucleotide position of 9099, 9101, 9102, 9797, and 9815.

As shown in Table 5, 7 patients including 5 females and 2 males harbored 5 mutations of mtDNA, and have not developed LHON. Two patients (Cases 1 and 2) harbored novel amino acid changes which have not been to associated with LHON, and 5 patients (Cases 3 to 7) harbored LHON mutations.

These mtDNA mutations were not detected in normal controls.

Table 5.

Case	mtDNA mutation	Patient
1	C9099A mutation (Ile to Met)	POAG (Male)

2	T9101G mutation (Ile to Ser)	POAG (Female)
3	T9101C mutation (Ile to Thr)	POAG (Female)
4	G9804A mutation (Ala to Thr)	POAG (Male)
5	G9804A mutation (Ala to Thr)	NTG (Female)
6	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 80%	POAG (Female)
7	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 15%	NTG (Male)

As described above, we found 5 mtDNA mutations including 2 novel mtDNA mutations in glaucoma patients. These results indicated that mtDNA mutations is one of the risk factor to develop or progress the glaucoma, and detection of the mtDNA mutations makes possible the early diagnosis and early treatment of glaucoma.

Example 3 Gene polymorphisms of the renin-angiotensin aldosterone system associate with risk for developing primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma

Purpose: Multiple environmental and genetic factors may be involved in pathogenesis of glaucoma. To predict genetic risk of glaucoma, an association study in gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone (R-A-A) system was performed.

MATERIALS and METHODS

Patients and Control study subjects

A total of 551 blood samples were collected at seven

institutes in Japan. They were 162 POAG patients, 193 NTG patients, and 196 normal subjects, and none of the subjects was related to others in this study.

The average age at examination was 58.8 ± 13.7 years in NTG, 62.0 ± 15.4 years in POAG, and 71.2 ± 10.4 years in normal subjects. The average age of the normal control subjects is significantly higher than NTG patients ($p < 0.001$) or POAG patients ($p < 0.001$), respectively. This could reduce the possibility that a subset will eventually develop glaucoma. The familial history was recorded in 66 (34.2%) out of 127 NTG patients and 49 (30.2%) out of 113 POAG patients. Male patients were 89 (46.1%) in NTG and 87 (53.7%) in POAG, and 77 (39.3%) in normal subjects.

One hundred ninety-six Japanese control samples were obtained from individuals who had no known eye abnormalities except cataract. These subjects were older than 40 years with IOP below 21 mmHg, no glaucomatous disc change, and no family history of glaucoma.

Genotyping

Seven genes and 10 polymorphisms in the R-A-A system were determined for each subject with glaucoma or normal Japanese control with renin (REN) I8-83G>A, angiotensin II type 1 receptor (AT1R) 1166A>C, -521C>T, -713T>G, angiotensin II type 2 receptor (AT2R) 3123C>A, cytochrome P45011B1 (CYP11B1) -344T>C, and chymase (CYM) 3123C>A, were identified

using by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) was determined only by PCR and agarose gel electrophoresis. To avoid the false determination of ACE/ID polymorphism, I allele specific amplification was carried out following the protocol of Lindpaintner et al (N Engl J Med 1995; 332: 706-711). Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol-chloroform extraction. The primer sets and restriction enzymes used were listed in Table 6.

Table 6. Primer pair sequences used for PCR amplification and restriction enzymes of polymorphic sites in renin angiotensin system

	Gene	Polymorphism	Primer sequences	Annealing temp	Product size	Restriction enzyme	Digested products
15	REN	18-83G>A	TGAGGTTGAGTCGGCCCCCT TCGCCAAACATGGCCACACAT	68°C	250bp	MboI	G: 250bp A: 171+79bp
	ACE	I/D 1st step	GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT GGATGGCTCTCCCGCCTTGTCTC	63°C	D: 319bp I: 597bp		
		2nd step	TGGCAGCACAGCGCCCGCCACTAC TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA	67°C	D/D: no product I: 335bp		
	AT1	1165A>C	GAGGTTGAGTGACATGTTGGAAC CGTCATCTGTCTAATGCAAAATGT	60°C	253bp	DdeI	A: 253bp C: 155+98bp
		-521C>T	CGTCATGTCTTTATCTGGTTTTC CGAAGCTTTGGTAATACAGTTGTGG	60°C	270bp	SspI	C: 270bp T: 144+126bp
-713T>G		AAACTACAGTCACCGCTACTCACCT TTCTTCACAAACTCTTCCAA	55°C	292bp	HinII	T: 170+122bp G: 292bp	
20	AT2	3123C>A	GGATTTCAGATTCTCTTTGAA GCATAGGAGTATGATTTAATC	53°C	340bp	AluI	C: 340bp A: 227+113bp
	CYP11B1	-344C>T	CAGGAGGGATGAGCAGGCAGGCACAG CTCACCCAGGAACCTGCTCTGGAAACATA	63°C	404 bp	HaeIII	C: 333bp + 71bp T: 404 bp
	CMA	-1903A>G	GGAAATGTGAGCAGATAGTGCAGTC AATCCGGAGCTGGAGAACTCTTCTC	51°C	285bp	BstXI	A: 285bp G: 195+90bp

The genotyping angiotensinogen (AGT) T174M, M235T was determined using by Invader assay®.

RESULTS

Genotype distribution of R-A-A system in Japanese population

Of 10 polymorphisms in R-A-A system, three showed a significantly difference in frequencies of genotypes:

- 5 REN/I8-83G>A for POAG, AT1/-713T>G for POAG, and AT2/3123C>A for NTG (Table 7). A 3123C>A polymorphism was associated with only female patients with NTG.

- A frequency of homozygous G genotype (GG) in AT1/-713T>G polymorphism was significantly higher ($p=0.04$ for TT+TG v GG) in POAG patients (4.2%) than in controls (0.5%). And a frequency of homozygous A genotype (AA) in REN/I8-83G>A polymorphism was significantly lower ($p=0.031$ for GG+GA v AA) in POAG patients (0.7%) than in controls (5.5%). A frequency of CA+AA genotypes in AT2/3123C>A polymorphism was significantly higher ($p=0.011$ for CC v CA+AA) in female patients with NTG (70.8%) than in female controls (55.0%).
- 10
- 15

Table 7. Association between glaucoma (POAG and NTG) and gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system.

Gene	Gene Polymorphism		Genotype Frequency		P
Renin	I8-83G>A		GG+GA	AA	0.031
		POAG (n=153)	152 (99.3%)	1 (0.7%)	
		NTG (n=185)	177 (95.7%)	8 (4.3%)	
		Control (n=183)	173 (94.5%)	10 (5.5%)	
AT1	-713T>G		TT+TG	GG	P
		POAG (n=165)	158 (95.8%)	7 (4.2%)	0.04
		NTG (n=208)	208 (100%)	0 (0.0%)	
		Control (n=198)	197 (99.5%)	1 (0.5%)	
AT2	3123C>A (Female)		CC	CA+AA	P
		POAG (n=79)	34 (43.0%)	45 (56.0%)	0.011
		NTG (n=120)	35 (29.2%)	85 (70.8%)	
		Control (n=111)	54 (45.0%)	66 (55.0%)	

Association between two promoter polymorphisms in AT1 in POAG patients

A frequency of POAG carriers with combined homozygous -521T and homozygous -713G (4.2%) was significantly higher (p=0.011) than that of normals (0%) (Table 8). Only POAG patients, neither NTG nor normal subjects, had this genotype.

Table 8. Distribution of genotypes of AT1 -521T allele and -713G allele

Group	A	B	P
POAG (n=165)	7 (4.2%)	158 (95.8%)	0.011
NTG (n=208)	0 (0.0%)	208 (100.0%)	
Control (N=198)	0 (0.0%)	198 (100.0%)	

A: Subjects with two -521 alleles and two -713G alleles

B: Subjects not satisfying the criteria for Group A.

These results indicated that gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system is one of important genetic risk factors for development of glaucoma. Detection of the REN/18-83G>A and AT1/-731T>G polymorphisms make possible the early diagnosis and early treatment of POAG. Especially, specific genotype of combined homozygous -521T and homozygous -713G in the AT1 gene is useful for the early diagnosis of POAG. Detection of the AT2/3123C>A polymorphisms make possible the early diagnosis and early treatment of female patient with NTG.

Example 4 Gene polymorphisms of the Endothelin gene associate with risk for developing normal-tension glaucoma

Methods

Patients

A total of 605 blood samples were collected. There were

178 POAG patients, 214 NTG patients, and 213 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study. Patients were considered to have POAG if they had a normal open-angle, a cup-disc ratio greater than 0.7 with typical glaucomatous visual field loss on either Goldmann or Humphrey perimetry, and the absence of ocular, rhinologic, neurological or systemic disorders which might be responsible for the optic nerve damage. Patients with NTG had an IOP of 21 mmHg or lower. Patients with exfoliative glaucoma, pigmentary glaucoma, and corticosteroid-induced glaucoma were excluded. Control samples were obtained from Japanese subjects who had no known eye abnormalities except for cataracts. These subjects had IOPs below 21 mm Hg, had normal optic discs, and no family history of glaucoma.

15 Detection of G/T polymorphism of endothelin (ET) gene by
Invader assay

DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods of phenol-chloroform extraction, and G/T polymorphism (Lys/Lys, Lys/Asn and Asn/Asn) at codon 198 in exon 5 of ET gene was determined by the Invader® assay. The primary probes (wild and mutant probes) and Invader® oligonucleotides (Invader® probe) used to detect the G/T polymorphism of ET gene are shown in Table 9.

Table 9.

Mutation	nucleotide change	Target	Probe	Sequence	T _m	Dye
EDN Ex5 GT	G to T	Sense	Wild	CGCGCGGAGGCTTGCCTTTCAGCTTGG	64.6	FAM
			Mutant	acggacgcggagATTGCCTTTCAGCTTGG	64.0	RED
			Invader	GTGTGGGTACATAACGCTCTCTGGAGGGT	76.9	

5 Invader® assay FRET-detection 96-well plates (Third Wave Technologies, Inc, Madison, WI) contains the generic components of an Invader® assay (Cleavase® enzyme VIII, FRET probes, MOPS buffer, and polyethylene glycol) dried in each of the individual wells. The detail method was described

10 previously. In brief, 8 µl of the primary probe/Invader®/mixture and total DNA (10 ng) samples were added to each well of a 96-well plate, and were denatured by incubation at 95° C for 10 min. After 15 µl of mineral oil (Sigma, St. Louis, MO) was overlaid on all reaction wells, the plate

15 was incubated isothermally at 63° C for 2 hours in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) and then kept at 4° C until fluorescence measurements. The fluorescence intensities were measured on a CytoFlour 4000 fluorescence plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA) with

20 excitation at 485 nm/20 nm (wavelength/ bandwidth) and emission at 530 nm/25 nm for FAM dye; excitation at 560 nm/20 nm and emission at 620 nm/40 nm for Redmond RED (RED) dye. Each sample was tested in duplicate in the same plate and two fluorescence measurements were performed in each plate. Thus,

25 four measurements were obtained for each sample and they were

averaged.

Results

The genotype frequencies of G/T polymorphism (Lys/lys, Lys/Asn and Asn/Asn) at codon 198 in exon 5 of ET gene are presented in Table 10.

Table 10. The genotype frequency at codon 198 in exon 5 of ET gene

Group	n	Genotype Frequency			P	Genotype Frequency		P
		Lys/lys	Lys/Asn	Asn/Asn		Lys/lys	Lys/Asn + Asn/Asn	
Control	213	94 (44.1%)	93 (43.7%)	26 (12.2%)		94 (44.1%)	119 (55.9%)	
NTG	214	120 (56.1%)	72 (33.6%)	22 (10.3%)	0.046	120 (56.1%)	94 (43.9%)	0.014
POAG	178	82 (46.1%)	77 (43.3%)	19 (10.7%)		82 (46.1%)	96 (53.9%)	

These results indicated that Lys/Lys homozygote of ET-1 gene at codon 198 in exon 5 is one of the risk factor to develop or progress the NTG, and detection of the Lys/Lys homozygote makes possible the early diagnosis and early treatment of NTG.

Example 5 Novel MYOC Gene Mutation, Phe369Leu, in Japanese Patients with Primary Open-angle Glaucoma Detected by Denaturing High-performance Liquid Chromatography

Purpose: To screen for mutations in the MYOC gene in Japanese patients with primary open-angle glaucoma (POAG) using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC).

Materials and Methods

Patients

Blood samples were collected from 171 POAG patients and 100 normal subjects at seven Japanese medical institutions.

5 The subjects were unrelated, and their mean age at the time of examination was 55.1 ± 16.0 (\pm standard deviation) years for the patients with POAG and 70.5 ± 10.6 years for the normal subjects. We purposely selected older control subjects to reduce the probability that a subset of them would develop
10 glaucoma.

A detailed family history was obtained by interviews in 55 POAG patients (32.2%). There were 91 men (53.2%) in the POAG patients, and 41 men (41.0%) in the normal subjects.

DNA Extraction and PCR Conditions

15 Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods. The seven exonic regions of the MYOC gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets listed in Table 11. For high-throughput analysis of the patients, samples from three patients were
20 pooled. The PCR reaction was performed with a thermal cycler (iCycler; Bio Rad, Hercules, CA) in a total volume of 25 μ l. The PCR conditions were: denaturation at 95° C for 9 min; followed by 35 cycles at 95° C for 1 min; 58° C for 30 sec (Table 1); and 72° C for 1.5 min; a final extension step was then carried
25 out at 72° C for 7 min. For heteroduplex formation, each PCR

product (25 μ l) was denatured at 95° C for 5 min and gradually cooled to 25° C.

For analyses of a few samples, each of seven exonic regions was amplified simultaneously by PCR in a 96-well plate (96-well Multiplate, MLP-9601; MJ Research, Waltham, MA). Seven wells were used for each patient. Primer sets were designed to be effective using a single annealing temperature of 58° C (Table 11).

10 Table 11. Primer sequences, product size, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon		Primer sequences (5' to 3')	Product size (bp)	PCR T _m (°C)	DHPLC T _m (°C)
15	1A	F AGC ACA GCA GAG OTT TCC AGA GGA R CTO CAG GTC TAA GCG TTG G	302	58.0	61.9
	1B	F CAG GCG ATG TCA GTC ATC CA R TCT CAT TTT OTT GCC TTA GTC	298	58.0	61.2, 64.5
	1C	F GAA ACC CAA ACC AGA GAG R ATA TCA COT GCT GAA CTO AGA GTC	255	58.0	61.0, 63.5
	2A	F CCT CAA CAT AGT CAA TCC TTG GGC R ACA TGA ATA AAG ACC ATG TGG GGA	245	58.0	56.3, 59.3
	3A	F GAT TAT GGA TTA AGT GGT GCT TCG R TGT CTC GGT ATT CAG CTC AT	375	58.0	58.3, 61.3, 62.3
	3B	F CAT AOT GCG TAG GCC ACT GGA R ATT GGC GAC TGA CTG OTT AC	337	58.0	60.9, 61.4
	3C	F GAA TCT GGA ACT CGA ACA AA R CTG AGC ATC TCG TTC TGC CAT	333	58.0	59.7, 61.7

20 Denaturing HPLC Analysis

For high-throughput analysis, a 25 μ l volume of PCR products from the three patients was automatically injected into the chromatograph for analysis using the WAVE® System for DHPLC analysis (Transgenomic, Omaha, NE). The DHPLC melting temperatures are listed in Table 1. For analysis of a small

number of samples, following 96-well-plate PCR, the plate was next placed in a WAVE[®] System programmed to automatically analyze each well at two to three melting temperatures. Approximately 3 hrs was sufficient time to analyze one individual's sample.

When abnormal chromatographic patterns were detected in the pooled samples by the high-throughput protocol, the sample was reanalyzed individually in the WAVE[®] System. The PCR product that showed the abnormal chromatographic pattern was then sequenced.

Direct DNA Sequencing

For direct sequencing, PCR products were purified with a QIA Quick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA) to remove unused primers and precursors. The PCR products were directly sequenced with the same forward and reverse PCR amplification primers on an ABI310 automated sequencer using BigDye chemistry according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Results

Screening of Pools of DNA in 171 Patients

Four DHPLC tracing patterns in the Exon3C region were shown in Figure 1. The upper most pattern (A) has a normal appearance, while the middle pattern (B) showed a broad shoulder, and the lower patterns (C and D) had a characteristic double peak pattern indicative of sequence variations in this

region. Sequencing analysis of samples B, C, and D revealed Thr448Pro, Pro481Ser, and Ala488Ala mutations (Table 12).

Four glaucoma-causing mutations were identified in 5 (2.9%) of 171 patients with POAG. In addition, eight polymorphisms and five synonymous codon changes were identified (Table 12). One novel missense mutation, Phe369Leu detected in exon 3 (Figure 2) was not present in 100 normal Japanese subjects. The three other missense mutations, Ile360Asn, Ala363Thr, and Thr448Pro have been reported in 10 Japanese patients with POAG.

Table 12. MYOC mutations and polymorphisms in patients with POAG and controls

	Exon	Sequence change	Amino acid change	Frequency	
				patients	controls
Mutations	3	c.1079T>A	Ile360Asn	1/171	0/100
	3	c.1087G>A	Ala363Thr	2/171	0/100
	3	c.1105T>C	Phe369Leu*	1/171	0/100
	3	c.1342A>C	Thr448Pro	1/171	0/100
Polymorphisms	1	c.34G>C	Gly12Arg	1/171	2/100
	1	c.57G>T	Gln19His	1/171	1/100
	1	c.136C>T	Arg46Stop	1/171	1/100
	1	c.210C>T	Val70Val†	2/171	0/100
	1	c.227G>A	Arg76Lys	14/171	9/100
	1	c.369C>T	Thr123Thr	1/171	0/100
	1	c.473G>A	Arg158Gln	1/171	1/100
	2	c.611C>T	Thr204Met	0/171	1/100
	2	c.624C>G	Asp208Glu	5/171	2/100
	3	c.864C>T	Ile288Ile	1/171	0/100
	3	c.1110G>A	Pro370Pro	0/171	1/100
	3	c.1441C>T	Pro481Ser	1/171	0/100
	3	c.1464C>T	Ala488Ala	3/171	1/100

* Novel myocilin mutation; † novel myocilin polymorphism.

Screening of Individual Patients by Plate PCR followed by DHPLC

A DHPLC tracing from a patient with POAG is shown in Figure 3. In the exon3B region, an abnormal tracing indicative of sequence variation can be seen, which proved to represent a Phe369Leu mutation on direct sequencing.

Example 6 Variants in Optineurin Gene and their Association with Tumor Necrosis Factor- α (-857C>T) Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma

Purpose: To investigate sequence variations in optineurin (OPTN) gene and their association with TNF- α polymorphism in Japanese patients with glaucoma.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and Control Subjects

A total of 651 blood samples were collected at seven institutions in Japan. There were 201 POAG patients, 232 NTG patients, and 218 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study.

DNA Extraction and PCR Conditions

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol-chloroform extraction. The 13 exonic coding regions of the OPTN gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets listed in Table 13.

A 20-base GC-clamp was attached to some of the forward primers

to detect mutations in the higher melting temperature domain by DHPLC analysis. In high-throughput analysis, samples from three patients were pooled. PCR was performed with a thermal cycler (iCycler, Bio-Rad; Hercules, CA) in a total volume of 20 μ l containing; 45 ng of genomic DNA, 2 μ l GeneAmp 10x PCR buffer II, 2 μ l of GeneAmp dNTP mix with a 2.0 mM concentration of each dNTP, 2.4 μ l of a 25 mM $MgCl_2$ solution; 4 pmol of each primer, and 0.1 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions were;

- 10 denaturation at 95° C for 9 min, followed by 35 cycles at 95° C for 1 min, 55° to 60° C for 30 sec (Table 13), and 72° C for 1 min and 30 sec, and a final extension step at 72° C for 7 min.

Table 13. Primer sequences, PCR product sizes, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon		Primer Sequences (5' to 3')	PCR product size (bp)	PCR T _m (°C)	DHPLC T _m (°C)
4	F	CCAGTGGGTTTGTGGGACTCC	317	60	61.7
	R	AAAGGGATGGCATTTCCTTGCA			
5	F	GTCCACTTTCCTGGTGTGTGACT	277	55	58.7
	R	CAACATCACAAATGGATCG			
6	F	AGCCTTAGTTTGATCTGTTCATTCA	293	60	57.0, 62.5
	R	GTTTCATCTTTCAGGGGAGGCT			
7	F	GC-clamp AATCCCTTGCAATTCGTGTTTT	188	55	59.4, 61.4, 62.4
	R	GTGACAAGCACCCAGTGACGA			
8	F	GC-clamp GGTTACTCTCTTCTTAGTCTTTGGA	320	57	54.6, 58.5
	R	GGGTGAACTGTATGGTATCTTAATT			
9	F	GC-clamp GCTATTTCTCTTAAAGCCAAAGAGA	242	55	57.4, 59.4
	R	CAGTGGCTGGACTACTCTCGT			
10	F	GC-clamp GTCAGATGATAATTGTACAGATAT	227	55	57.8, 59.8
	R	AATGTATATTTCAAAGGAGGATAAA			
11	F	CCACTGCGACGTAAAGGAGCA	286	60	57.5, 59.5
	R	CAAATCCGAATCCAATCTGTATAA			
12	F	GC-clamp GGTTGGGAGGCAAGACTATAAGTT	233	60	55.5, 56.5
	R	TTCTGTTCACTTACTAGGCTATGGAA			
13	F	CAGGCAGAATTATTTCAAAACCAT	264	60	58.9, 61.9
	R	CGAGAATACAGTCAGGGCTGG			
14	F	GCACTACCTCCTCATCGCATAAACA	260	60	56.7, 59.7
	R	GGCCATGCTGATGTGAGCTCT			
15	F	GC-clamp GGA CTGTCTGCTCAGTGTGTCA	282	60	56.0, 59.0, 61.0
	R	GGTGCTTGATTGGAATCCA			
16	F	GC-clamp CACA ACTGCCTGCAAAATGGA ACT	294	60	61.7
	R	GAGGC AAAATATTTGAGTGAAAACA			
		GC-clamp: CGCCGCGCCGCGCCGCGCGC			

Denaturing HPLC Analysis

- 5 DHPLC analysis was performed using the WAVE® SYSTEMS (Transgenomic, Omaha, NE). For heteroduplex formation, products of each PCR (20 µl) were denatured at 95° C for 5 min and gradually cooled to 25° C. The annealed PCR products from the three mixed samples were automatically injected into a
- 10 DNASep® cartridge (Transgenomic, Omaha, NE).

Buffer A (Transgenomic, Omaha, NE) was made up of 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), and Buffer B of 0.1 M TEAA and 25% acetonitrile. Analysis was carried out at a flow rate of 0.9 ml/min and the Buffer B gradient increased by 2%/min for 4.5 min. Elution of DNA fragments from the cartridge was detected by absorbance at 260 nm. The temperatures used for the analysis were selected according to the sequences of the DNA fragments. The WAVEMAKER software (v.4.1, Transgenomic, Omaha, NE) predicted the melting behavior of the DNA fragments at various temperatures. The predicted melting domains within the DNA fragment determined the temperatures for the DHPLC analysis (Table 13). When abnormal chromatographic patterns were detected in a pool of three samples, each of the three samples was re-analyzed individually in the WAVE® SYSTEM. Then, the PCR product that showed an abnormal chromatographic pattern was sequenced.

Direct DNA Sequencing

To detect mutations by direct sequencing, the PCR products were first purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) to remove unreacted primers and precursors. The sequencing reactions were then performed using the ABI PRISM BigDye Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The data were collected by the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by the ABI PRISM

sequencing analysis program (v.3.7).

Genotyping OPTN c.412G>A (Thr34Thr) Polymorphism

The G to A substitution at position c.412 in exon 4 of the OPTN gene was detected by using restriction enzyme, HpyCH₄IV (New England BioLabs, Beverly, MA), with the same primers listed in Table 13 for the DHPLC analysis. The G allele sequence was cut into two fragments (188 bp + 129 bp) by HpyCH₄IV, while the A allele sequence remained intact (317 bp).

Genotyping TNF- α -857C>T Polymorphism

Genotyping the -857C>T polymorphism in the TNF- α promoter region was performed according to Kato et al. (Am J Med Genet 1999;88:301-304) using the forward primer, 5'-AAATCGAGTATGGGGACCCCCGTTAA-3', and the reverse primer, 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'. The forward primer contained one nucleotide mismatch (bold and underlined), which allowed the use of the restriction enzyme, HincII (TaKaRa, Shiga, Japan). The C allele sequence was cut into two fragments (106 bp + 25 bp) by HincII, while the T allele sequence remained intact (131 bp).

Statistical Analyses

The frequencies of the genotypes and alleles in patients and controls were compared with the chi-square test and Fisher's exact test. The odds ratio and 95% confidence intervals (CI) also were calculated. The Hardy-Weinberg equilibrium for the observed frequencies was also calculated.

The clinical features were analyzed for differences associated with the genotypes using unpaired t test. Statistical analysis was performed with StatMate III (ATMS, Tokyo, Japan). A p value of <0.05 was considered to be significant.

5 RESULTS

OPTN Variants in Japanese Subjects

A total of 651 Japanese subjects were studied, and the results are presented in Table 14.

10 Table 14. OPTN variants observed in glaucoma patients and control subjects

Location	Sequence Changes	Codon Changes	Frequency in Subjects (%)		
			POAG	NTG	Control
Exon 4	c.386C>G	His26Asp	1 / 201 (0.5)	0 / 232 (0)	0 / 218 (0)
Exon 4	c.449-451delCTC	Leu47del	0 / 201 (0)	0 / 232 (0)	1 / 218 (0.5)
Exon 5	c.603T>A	Met98Lys	33 / 201 (16.4)	50 / 232 (21.6)	36 / 218 (16.5)
Exon 16	c.1944G>A	Arg545Gln	14 / 192 (7.3)	15 / 222 (6.8)	11 / 214 (5.1)
Exon 4	c.412G>A	Thr34Thr	69 / 201 (34.3)	74 / 232 (31.9)	52 / 218 (23.9)
Exon 4	c.421G>A	Pro37Pro	0 / 201 (0)	1 / 232 (0.4)	0 / 218 (0)
Exon 4	c.457C>T	Thr49Thr	2 / 201 (1)	0 / 232 (0)	0 / 218 (0)
Exon 16	c.2023C>T	His571His	0 / 162 (0)	0 / 193 (0)	2 / 196 (1.0)
Intron 4	c.476+15C>A		0 / 201 (0)	0 / 232 (0)	1 / 218 (0.5)
Intron 6	c.863-10G>A *		N/C†	N/C	N/C
Intron 6	c.863-5C>T *		N/C	N/C	N/C
Intron 8	c.1089+20G>A		4 / 133 (3.0)	11 / 172 (6.4)	4 / 126 (3.2)
Intron 9	c.1192+19C>T		0 / 133 (0)	4 / 172 (2.3)	3 / 130 (2.3)
Intron 11	c.1458+28G>C		1 / 133 (0.8)	4 / 172 (2.3)	0 / 157 (0)
Intron 15	c.1922+10G>A		2 / 133 (1.5)	4 / 172 (2.3)	1 / 157 (0.6)
Intron 15	c.1922+12G>C		0 / 133 (0)	1 / 172 (0.6)	0 / 157 (0)
Intron 15	c.1923-48C>A *		N/C	N/C	N/C

* Sequence variation was found by direct sequencing analysis.

† Not checked

Seventeen sequence changes were identified in the glaucoma patients and control subjects. Among these, 3 were

missense changes, 1 was a deletion of one amino acid residue, 4 were synonymous codon changes, and 9 were changes in noncoding sequences. One possible disease causing-mutation, His26Asp, was identified in one POAG proband and her relatives with NTG, and was not present in the 218 normal Japanese controls. A deletion of Leu47 (3-bp deletion, CTC) was found in 1 control.

Four synonymous nucleotide substitutions, c.412G>A (Thr34Thr), c.421G>A (Pro37Pro), c.457C>T (Thr49Thr), and c.2023C>T (His571His) were found. The Thr34Thr substitution was present in 69 POAG patients, 74 NTG patients, and 52 controls, and the Pro37Pro was found in 1 NTG patient. The Thr49Thr was identified in 2 POAG patients, and the His571His was present in 2 controls.

Distribution of OPTN Variants in Japanese Subjects

The Thr34Thr (c.412G>A) polymorphism was significantly associated with POAG and NTG in both genotype frequency and allele frequency (Table 15). The most significant association was found in patients with POAG and controls ($P = 0.010$ in genotype frequency and $P = 0.004$ in allele frequency). The observed genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 15. Genotype distribution and allele frequency of optineurin gene polymorphisms in cases and controls

412G>A (Thr34Thr)																
Characteristics	n	Genotype frequency (%)			p value*	Genotype frequency (%)			p value*	Genotype frequency (%)			Allele frequency (%)			p value*
		G/G	G/A	A/A		G/G	G/A+A/A	G/G+G/A		A/A	G	A				
POAG	201	132 (65.7)	59 (29.3)	10 (5.0)	0.01 ‡	132 (65.7)	69 (34.3)	0.018 ‡	191 (95.0)	10 (5.0)	0.017 ‡	323 (80.3)	79 (19.7)	0.004 #		
NTG	232	158 (68.0)	66 (28.5)	8 (3.5)	0.062	158 (68.0)	74 (32.0)	0.058	224 (96.5)	8 (3.5)	0.107	382 (82.3)	82 (17.7)	0.027 ‡		
H-NTG _q	168	112 (66.7)	48 (28.5)	8 (4.8)	0.021 ‡	112 (66.7)	56 (33.3)	0.040	160 (95.2)	8 (4.8)	0.024 ‡	272 (81.0)	64 (19.0)	0.011 ‡		
L-NTG _o	64	46 (71.9)	18 (28.1)	0 (0)	0.496	46 (71.9)	18 (28.1)	0.487	64 (100)	0 (0)	1	110 (85.9)	18 (14.1)	0.617		
Control	218	166 (76.1)	50 (22.9)	2 (1.0)		166 (76.1)	52 (23.9)		216 (99.0)	2 (1.0)		382 (87.6)	54 (12.4)			

603T>A (Met98Lys)																			
Characteristics	n	Genotype frequency (%)					Genotype frequency (%)					Genotype frequency (%)					Allele frequency (%)		
		T/T	T/A	A/A	p value*		T/T	T/A+A/A	p value*		T/T+T/A	A/A	p value*		T	A	p value*		
POAG	201	168 (83.6)	32 (15.9)	1 (0.5)	0.998		168 (83.6)	33 (16.4)	0.979		200 (99.5)	1 (0.5)	1	368 (91.5)	34 (8.5)	0.988			
NTG	232	182 (78.4)	45 (19.4)	5 (2.2)	0.168		182 (78.4)	50 (21.6)	0.174		227 (97.8)	5 (2.2)	0.217	409 (88.1)	55 (11.9)	0.096			
H-NTG _q	168	131 (78.0)	32 (19.0)	5 (3.0)	0.096		131 (77.8)	37 (22.2)	0.171		163 (97.0)	5 (3.0)	0.090	294 (87.5)	42 (12.5)	0.068			
L-NTG _o	64	51 (79.7)	13 (20.3)	0 (0)	0.673		51 (79.7)	13 (20.3)	0.481		64 (100)	0 (0)	1	115 (79.7)	13 (20.3)	0.559			
Control	218	182 (83.5)	35 (16.0)	1 (0.5)			182 (83.5)	36 (16.5)			217 (99.5)	1 (0.5)		399 (91.5)	37 (8.5)				

* p value for χ^2 test.

p value for Fisher's exact test.

q H means high-tension NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

o L means low-tension NTG. Maximum IOP ≤ 15 mmHg.

‡ p < 0.05.

p < 0.01.

The clinical characteristics of the glaucoma patients, such as age at diagnosis, IOP at diagnosis, and visual field score at diagnosis, were examined for association with c.412G>A (Thr34Thr) and c.603T>A (Met98Lys) polymorphisms as listed in Table 16. The glaucoma patients did not show an association with the clinical characteristics for the G/G and G/A+A/A genotypes in Thr34Thr or for the T/T and T/A+A/A genotypes in Met98Lys.

Table 16. Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to OPTN genotypes

c412G>A (Thr34Thr)

	Phenotype Variable	G/G	G/A+A/A	p value*
5	POAG Age at diagnosis (ys)	53.5 ± 16.4 (n = 129)	54.5 ± 15.9 (n = 69)	0.680
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.5 ± 7.9 (n = 84)	26.8 ± 7.3 (n = 41)	0.608
	Visual field score at diagnosis	3.1 ± 0.9 (n = 131)	3.2 ± 1.0 (n = 68)	0.139
	NTG Age at diagnosis (ys)	57.1 ± 13.3 (n = 154)	54.5 ± 13.2 (n = 74)	0.167
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.7 ± 2.4 (n = 158)	16.9 ± 2.1 (n = 74)	0.539
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 156)	2.7 ± 0.7 (n = 74)	0.313
	H-NTG Age at diagnosis (ys)	58.4 ± 12.9 (n = 109)	54.4 ± 12.6 (n = 42)	0.117
	IOP at diagnosis (mm Hg)	18.0 ± 1.5 (n = 111)	17.8 ± 1.6 (n = 42)	0.428
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 111)	2.7 ± 0.7 (n = 42)	0.385

c603T>A (Met98Lys)

	Phenotype Variable	T/T	T/A+A/A	p value*
10	POAG Age at diagnosis (ys)	53.4 ± 16.0 (n = 165)	56.2 ± 17.1 (n = 33)	0.365
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.2 ± 7.3 (n = 152)	27.2 ± 8.3 (n = 29)	1
	Visual field score at diagnosis	3.1 ± 0.9 (n = 166)	3.3 ± 1.0 (n = 33)	0.254
	NTG Age at diagnosis (ys)	56.3 ± 13.6 (n = 181)	56.1 ± 12.3 (n = 47)	0.927
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.7 ± 2.3 (n = 182)	17.0 ± 2.4 (n = 50)	0.419
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 181)	2.8 ± 0.6 (n = 49)	1
15	H-NTG Age at diagnosis (ys)	57.3 ± 13.0 (n = 130)	57.4 ± 11.9 (n = 35)	0.967
	IOP at diagnosis (mm Hg)	17.8 ± 1.5 (n = 131)	18.1 ± 1.5 (n = 37)	0.284
	Visual field score at diagnosis	2.7 ± 0.7 (n = 130)	2.8 ± 0.4 (n = 37)	0.408

* p values for unpaired t test.

H means high-tension NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

Association between OPTN Polymorphism and TNF-α Polymorphism in Glaucoma Patients

20 No significant difference in genotype or allele frequency was noted between patients and controls for the -857C>T genotype in the promoter region of the TNF-α gene (data not shown). The observed genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg

25 equilibrium. However, among individuals with the C/T+T/T

genotype (or -857T carriers) in the TNF- α gene, 42.2% of POAG patients were OPTN/412A carriers compared to 21.6% of controls (Table 17). This difference in frequency was significant ($P = 0.009$). This association was not observed in patients who were OPTN/603A (98Lys) carriers.

Table 17. Distribution of OPTN genotypes (c.412G>A and c.603T>A) according to TNF- α genotypes (-857C>T) in glaucoma patients and controls

c.412G>A (T=34T=)									
Phenotype	-857C>T		C/C (%)		p value*	Odds ratio	95 % CI	C/T+T/T (%)	
	c.412G>A	C/G	C/A + A/A					C/G	C/A + A/A
POAG	95 (69.3)	42 (30.7)	0.290	1.33		37 (57.5)	27 (42.5)	0.009 ^q	2.63
				(0.79 - 2.24)					(1.26 - 5.56)
NTG	106 (66.3)	54 (33.7)	0.093	1.53		52 (72.2)	20 (27.8)	0.388	1.39
				(0.93 - 2.52)					(0.65 - 2.97)
H-NTG	75 (64.1)	42 (35.9)	0.056	1.68		37 (72.5)	14 (27.5)	0.453	1.37
				(0.59 - 2.87)					(0.60 - 3.14)
Control	108 (75.0)	36 (25.0)				58 (78.4)	16 (21.6)		

c.603T>A (M=98Lys)									
Phenotype	-857C>T		C/C (%)		p value*	Odds ratio	95 % CI	C/T+T/T (%)	
	c.603T>A	T/T	T/A + A/A					T/T	T/A + A/A
POAG	113 (82.5)	24 (17.5)	0.729	1.12		55 (85.9)	9 (14.1)	0.573	0.77
				(0.60 - 2.09)					(0.30 - 1.94)
NTG	121 (75.6)	39 (24.4)	0.069	1.70		61 (84.7)	11 (15.3)	0.769	0.85
				(0.96 - 3.01)					(0.32 - 2.04)
H-NTG	88 (75.2)	29 (24.8)	0.076	1.73		43 (84.3)	8 (15.7)	0.782	0.87
				(0.94 - 3.20)					(0.33 - 2.29)
Control	121 (84.0)	23 (16.0)				61 (82.4)	13 (17.6)		

* p values for χ^2 test.

H means high-ton NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

^q p < 0.01

In POAG patients, those who were TNF- α /-857T and OPTN/412A carriers were associated with significantly worse ($P = 0.034$) visual field scores than those who were TNF- α /-857T and non-OPTN/412A carriers (Table 18). This association was not observed in patients with H-NTG.

Table 18. Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to OPTN genotypes (c.412G>A and c.603T>A) and TNF- α genotypes (-857C>T)

c.412G>A (Ttr34Ttr)		C/C			C/T+T/T		
(TNF- α genotypes)		C/C		p value ^a	C/T+T/T		p value ^a
(OPTN genotypes)		C/C	C/A+A/A		C/C	C/A+A/A	
POAG	Age at diagnosis (yr)	54.9 \pm 16.2 (n=93)	57.1 \pm 13.6 (n=45)	0.445	49.9 \pm 16.3 (n=36)	50.5 \pm 18.3 (n=27)	0.891
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.5 \pm 7.9 (n=84)	26.8 \pm 7.3 (n=41)	0.635	27.2 \pm 7.4 (n=33)	26.0 \pm 5.6 (n=23)	0.514
	Visual field score	3.1 \pm 0.9 (n=95)	3.2 \pm 1.0 (n=41)	0.566	2.9 \pm 0.9 (n=35)	3.4 \pm 0.9 (n=27)	0.0344
H-NTG	Age at diagnosis (yr)	58.0 \pm 13.7 (n=73)	54.4 \pm 12.6 (n=42)	0.163	59.4 \pm 11.1 (n=35)	57.5 \pm 11.4 (n=14)	0.392
	IOP at diagnosis (mm Hg)	18.0 \pm 1.5 (n=75)	17.8 \pm 1.6 (n=42)	0.501	17.9 \pm 1.5 (n=36)	17.6 \pm 1.6 (n=14)	0.536
	Visual field score	2.9 \pm 0.7 (n=75)	2.7 \pm 0.7 (n=42)	0.141	2.7 \pm 0.7 (n=35)	2.6 \pm 0.5 (n=14)	0.629

c.603T>A (Ttr34Ttr)		C/C			C/T+T/T		
(TNF- α genotypes)		T/T		p value ^a	T/T		p value ^a
(OPTN genotypes)		T/T	T/A+A/A		T/T	T/A+A/A	
POAG	Age at diagnosis (yr)	54.9 \pm 14.7 (n=112)	58.3 \pm 18.4 (n=24)	0.301	50.3 \pm 18.1 (n=34)	50.1 \pm 10.8 (n=9)	0.987
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.2 \pm 7.5 (n=106)	27.5 \pm 8.8 (n=20)	0.874	26.4 \pm 6.8 (n=45)	26.4 \pm 6.9 (n=9)	1
	Visual field score	3.1 \pm 0.9 (n=112)	3.4 \pm 0.9 (n=24)	0.141	3.1 \pm 0.9 (n=54)	3.1 \pm 1.1 (n=9)	1
H-NTG	Age at diagnosis (yr)	56.8 \pm 13.6 (n=87)	56.2 \pm 12.5 (n=23)	0.835	58.3 \pm 11.6 (n=43)	56.8 \pm 13.6 (n=7)	0.758
	IOP at diagnosis (mm Hg)	17.9 \pm 1.5 (n=88)	17.9 \pm 1.4 (n=23)	1	17.7 \pm 1.5 (n=43)	18.8 \pm 1.5 (n=8)	0.069
	Visual field score	2.8 \pm 0.8 (n=88)	2.9 \pm 0.3 (n=23)	0.836	2.6 \pm 0.7 (n=42)	2.8 \pm 0.4 (n=8)	0.439

^a p values for unpaired t test.

H means high-tension NTG. Maximum IOP \geq 16 mmHg.

^a p < 0.05

Example 7. Correlation between Gene Polymorphism of angiotensin II type 2 receptor and the IOP reducing effect of angiotensin II receptor blocker

15 Methods

Patients

X染色体上に存在する多型であるアンギオテンシン II 受容体 2 (AT2) 遺伝子の塩基番号 3123 位に C (シトシン) を持つ男性 9 名、A (アデニン) を持つ男性 4 名、CC を持つ女性 4 名、CA を持つ女性 4 名に、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンシレキセチルを経口投与し、投与後 1 から 24 時間後の眼圧の推移を測定した。

RESULTS

薬剤投与後 1 から 24 時間後の眼圧の推移について、Table 19 に示す。

Table 19.

内服前 Base Line	眼圧下降量mmHg							遺伝子多型AT2/31230>A				
	1時間後	2時間後	3時間後	4時間後	5時間後	6時間後	24時間後	男性	男性	女性	女性	
0	-2	-1	-3	-2	-1	-1	-1		A			I
0	-2	-2	0	0	-1	1	1		A			
0	1	1	0	0	-2	-2	0		A			
0	0	0	-2	1	0	0	-1	C				
0	-1	-3	-5	-2	-3	-3	-3	C				II
0	0	-3	-2	-4	-3	0	0				CA	
0	-1	-1	-4	-3	-4	-3	1	C				
0	-2	-4	-4	-4	-4	-5	-2	C				
0	-2	-3	-3	-2	-2	1	2			CC		III
0	-2	-3	-2	-5	-3	-3	0	C				
0	-4	-6	-6	-6	-6	-4	-5				CA	
0	-4	-5	-6	-5	-5	-5	-7	C				
0	-4	-6	-6	-8	-5	-5	-4				CA	III
0	-2	-3	-6	-5	-6	-3	-3	C				
0	-2	-4	-4	-6	-3	-4	-5				CA	
0	-4	-8	-6	-7	-6	-6	-2			CC		
0	-4	-4	-5	-9	-5	-4	-3	C				III
0	-1	-4	-6	-3	-6	-4	0			CC		
0	-2	-4	-7	-5	-7	-6	-3			CC		
0	-2	-7	-6	-4	-6	-6	-1	C				
0	-6	-8	-8	-12	-12	-12	-12		A			

I: 眼圧下降無効例

4例中3例はA

II: 眼圧下降効果+例

6例中5例はCまたはCC

III: 眼圧下降効果++例

11例中7例はCまたはCC

すなわちAを持つと眼圧が下がり難く、Cを持つと下がりやすい

多型はX染色体

男性はCまたはAを持つ

女性はCC、CAまたはAAを持つ

AT2 遺伝子の塩基番号 3123 に A を持つ男性がアンギオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンシレキセチルを内服すると、75%の割合で眼圧が下がり難かったが、C を持つ男性は 100%の割合で眼圧が低下した。一方、女性の場合、CC を持つ人は 100%の割合で眼圧が低下した。

上記結果より、AT2 遺伝子多型と薬効との間に相関関係があることが示唆された。

Example 8. Correlation between Gene Polymorphism of endothelin and glaucoma

Methods

POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、エンドセリン関連遺伝子の多型と緑内障との関連について、インベーター法を用い調べた。

Results

5 男性において次の関連が認められた。

1) エンドセリンのエキソン 1 の A138insertion/deletion (A138I/D) 多型は、POAG および NTG とともに関連が認められた (Table 20)。

2) エンドセリン受容体 A のプロモーター領域の-231A>G 多型は、NTG (特に最高眼圧が 15mmHg 以下) と関連が認められた (Table 21)。

10 3) エンドセリン受容体 A のエキソン 6 にある His323His (CAC TO CAT) において C>T 多型は、NTG (特に最高眼圧が 15mmHg 以下) と関連が認められた (Table 22)。

4) エンドセリン受容体 B のエキソン 4 にある Leu277Leu において、G>A 多型は、POAG および NTG とともに関連が認められた (Table 23)。

15

女性において次の関連が認められた。

1) エンドセリンの K198N (Lys198Asn) 多型は、NTG と関連が認められた (Table 24)。

20 2) エンドセリンのプロモーター領域の-1370T>G 多型は、NTG と関連が認められた (Table 25)。

3) エンドセリン受容体 A の 3' non-coding region の+70C>G (stop codon から 70 番目) 多型は、POAG と関連が認められた (Table 26)。

25 4) エンドセリン受容体 A の 3' non-coding region の+1222C>T (stop codon から 1227 番目) 多型が、NTG (眼圧が 16mmHg-21mmHg) と関連が認められた (Table 27)。

Table 20. Endothelin A138I/D (Male)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test
		Frequency				Frequency			Frequency		
		I/I	I/D	D/D		I/I	I/D+D/D		I/I+I/D	D/D	
Control	100	4	34	62		4	96		38	62	
POAG	100	3	21	76		3	97		24	76	0.002
NTG	119	1	28	90		1	118		29	90	0.029

Table 21. Endothelin Receptor A -231A>G (Male)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		AA	AG	GG		AA	AG+GG		AA+AG	GG	
Control	100	22	45	33		22	78		67	33	
POAG	100	24	51	25		24	76		75	25	
NTG	119	30	60	29		30	89		90	29	
H-NTG	89	17	45	27		17	72		62	27	
L-NTG	11	1	2	2	0.017	5	10	0.026	25	2	0.022

5 H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: NTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg or less.

Table 22. Endothelin Receptor A H323H C>T His323His (Male)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	100	9	40	51		9	91		49	51	
POAG	100	7	38	55		7	93		45	55	
NTG	119	11	50	58		11	108		61	58	
H-NTG	89	7	32	50		7	82		39	50	
L-NTG	25	4	14	7		4	21				0.029

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 5 15mmHg or less.

Table 23. Endothelin Receptor B L277L G>A Leu277Leu (Male)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test
		Frequency				Frequency			Frequency		
		GG	GA	AA		GG	GA+AA		GG+GA	AA	
Control	100	18	41	41		18	82		59	41	
POAG	100	26	48	26		26	74		26	26	0.025
NTG	119	26	61	32		26	93		32	32	0.027

Table 24. Endothelin Lys198Asn G>T or K198N (Female)

	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		χ^2 test p
		KK	KN	NN		KK	KN+NN		KK+KN	NN	
Control	124	52	59	13		52	72		111	13	
POAG	76	38	33	5		38	38		71	5	
NTG	131	66	59	6	0.007	76	55	0.0010	114	17	

Table 25. Endothelin -1370T>G (Female)

	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		χ^2 test p
		TT	TG	GG		TT	TG+GG		TT+TG	GG	
Control	124	66	56	2		66	58		122	2	
POAG	76	49	24	3		49	27		73	3	
NTG	131	84	39	8	0.013	84	47		123	8	

5 Table 26. Endothelin Receptor A +70C>G (Female)

	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		χ^2 test p
		CC	CG	GG		CC	CG+GG		CC+CG	GG	
Control	124	29	59	36		29	95		88	36	
POAG	76	28	32	16		28	48	0.043	60	16	
NTG	131	35	66	30		35	96		101	30	

Table 27. Endothelin Receptor A +1222C>T (Female)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	124	74	42	8		74	50		116	8	
POAG	76	40	30	6		40	36		70	6	
NTG	131	66	54	11		66	65		120	11	
H-NTG	92	42	42	8		42	50	0.04	84	8	
L-NTG	35	21	11	3		21	14		32	3	

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: NTG patients with maximal intraocular pressure at 5 15mmHg or less.

Example 9. Correlation between Gene Polymorphism of Adrenalin receptor and Glaucoma

Methods

- 10 POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、アドレナリン受容体遺伝子の多型と緑内障との関連について、PCR-RFLP 法を用い調べた。

Results

β 1-アドレナリン受容体の Arg389Gly 多型は、NTG と関連が認められた (Table 28)。

Table 28. β 1-Adrenalin Receptor Arg389Gly

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CG	GG		CC	CG+GG		CC+CG	GG	
Control	240	147	78	15		147	93		225	15	
POAG	191	127	58	6		127	64		185	6	
NTG	284	197	80	7	0.002	197	87		284	7	0.031

Example 10. Correlation between Gene Polymorphism of E-Selectin and glaucoma

5 Methods

POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、E-selectin 遺伝子の多型と緑内障との関連について、インバーダー法を用い調べた。

Results

E-selectin の 1402C>T 多型は、POAG、NTG ともに関連が認められた (Table 29)。

Table 29. E-selectin 1402C>T

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	224	138	67	19		138	86		205	19	
POAG	250	150	90	10		150	100		240	10	0.002
NTG	176	117	53	6		117	59		170	6	0.007

Example 11. Correlation between Gene Polymorphism of Paraoxonase 1 and Glaucoma

Methods

POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、PON1（パラオキシナーゼ 1）遺伝子の多型と緑内障との関連について、インバーダー法を用い調べた。

Results

PON1 遺伝子の Gly192Arg (Q192R) 多型は、POAG と関連が認められた (Table 30)。

PON1 遺伝子の Leu54Met (L54M) 多型は、NTG (特に最高眼圧が 15mmHg 以下) と関連が認められた (Table 31)。

Table 30 PON1 Gly192Arg (Q192R)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		QQ	QR	RR		QQ	QR+RR		QQ+QR	RR	
Control	224	32	107	85		32	192		139	85	
POAG	110	1	8	57	0.009	1	35	0.021	36	57	0.016
NTG	160	32	66	62		32	128		98	62	

Table 31 PON1 Leu54Met (L54M)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		χ^2 test
		Frequency				Frequency			Frequency		
		LL	LM	MM		LL	LM+MM		LL+LM	MM	
Control	226	192	34	0		192	34		226	0	

POAG	110	97	13	0		97	13		110	0	
NTG	160	142	105	58	101	144	16		157	3	
H-NTG	122	111	10	1		111	11		121	1	
L-NTG	34	29	1	2	0	29	5		27		

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg or less.

CLAIMS

1. 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程を含む、生体試料の遺伝子多型の検出方法。

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはア

5 スパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損

10 (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

15 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

(8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

20 (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

(12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン

(13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン

25 (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチ

ミンまたはグアニン

(15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 521 位がシ
トシンまたはチミン

(16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシ

5 トシンまたはアデニン

(17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニ
ンまたはアデニン

(18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシ
ンまたはアデニン

10 (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま
たはシトシン

(20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジ
ンまたはセリン

(21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型

15 (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型

(23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190
位がグアニンまたはシトシン

(24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677
位がシトシンまたはチミン

20 (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン
またはアルギニン

(26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたは
メチオニン

(27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイ
ンまたはセリン

25

- (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- 5 (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- (31) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- (32) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- 10 (33) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン
- 15 (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- (36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- (37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン
- 20 (38) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン
- (39) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン
2. 以下の工程 [I] から [III] を含む、視神経症の診断方法。
- 25 [I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1

つを解析する工程

- (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはア
スパラギン
- (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグア
5 ニン
- (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号 138 位にアデニンが挿入ま
たは欠損
- (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンま
たはグアニン
- 10 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシン
またはチミン
- (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位がヒスチジ
ンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンま
15 たはグアニン
- (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシン
をコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- 20 (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチ
ミンまたはグアニン
- 25 (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシ

トシンまたはチミン

(16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシ
トシンまたはアデニン

5 (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニ
ンまたはアデニン

(18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシ
ンまたはアデニン

(19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま
たはシトシン

10 (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジ
ンまたはセリン

(21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型

(22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$) 遺伝子多型

15 (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190
位がグアニンまたはシトシン

(24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677
位がシトシンまたはチミン

(25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン
またはアルギニン

20 (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたは
メチオニン

(27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイ
ンまたはセリン (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子の
プロモーター領域における 1G/2G

25 (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306

位がシトシンまたはチミン

(30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

(31) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン

5 またはグリシン

(32) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

(33) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

10 (34) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

(35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

15 (36) OPTN (オプチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

(38) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

20 (39) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

[I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型から視神経症の遺伝的リスクを求める工程。

3. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項 2 記載の方法。

25 4. さらに視神経症に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求

項2に記載の視神経症の診断方法。

5. 以下の工程[I]から[III]を含む、緑内障の診断方法。

(I) 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程

- 5 (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン
- (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン
- (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損
- 10 (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
- 15 (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン
- (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシン
- 20 をコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- 25 (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン

- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- 5 (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (17) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- (18) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシン
10 ンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- 15 (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$) 遺伝子多型
- (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677
20 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたはメチオニン
- 25 (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイ

ンまたはセリン

(28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G

(29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306

5 位がシトシンまたはチミン

(30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

(31) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン

10 (32) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

(33) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(34) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ

15 オニンまたはイソロイシン

(35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

(36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

20 (37) SELE (E-セレクトチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

[I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型から緑内障の遺伝的リスクを求める工程。

25 6. 工程 [I] において、さらに緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析する

ことを含む、請求項5に記載の緑内障の診断方法。

7. 請求項5の工程[I]において、(1)、(2)、(5)～(7)、(16)、(19)～(22)および(26)の遺伝子多型のいずれか少なくとも1つを解析することを特徴とする正常眼圧緑内障の診断方法。

5 (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

10 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

15 (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

(19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン

20 (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

(21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型

(22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$) 遺伝子多型

(26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたはメチオニン

25 8. さらに正常眼圧緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、

請求項7に記載の診断方法。

9. 請求項4の工程[I]において、(4)、(9)～(11)、(14)～(15)、(25) および(35)のいずれか少なくとも1つの遺伝子多型を解析することを特徴とする高眼圧緑内障の診断方法。

5 (4) EDNRA (エンドセリン受容体A) 遺伝子：塩基番号70位がシトシンまたはグアニン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9099位がシトシンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9101位がチミンまたはグアニン

(11) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9101位がチミンまたはシトシン

10 (14) AT1 (アンギオテンシンII受容体1) 遺伝子：塩基番号-713位がチミンまたはグアニン

(15) AT1 (アンギオテンシンII受容体1) 遺伝子：塩基番号-521位がシトシンまたはチミン

(25) PON1 (パラオキシナーゼ1) 遺伝子：コドン番号192位がグリシン

15 またはアルギニン

(35) ミオシリン遺伝子：コドン番号369位がフェニルアラニンまたはロイシン

10. さらに高眼圧緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項9に記載の診断方法。

20 11. 以下の工程[I]から[IIII]を含む、レーベル病の診断方法。

[I]生体試料において、以下に示す遺伝子多型のいずれか少なくとも1つを解析する工程

(38) TP53 遺伝子：コドン番号72位がアルギニンまたはプロリン

(39) EPHX1 (ミクロソーム型エポキシドヒドラーゼ) 遺伝子：コドン番号

25 113位がチロシンまたはヒスチジン

[I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型からレーベル病の遺伝的リスクを求める工程。

12. 工程[I]において、さらにレーベル病に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項11に記載のレーベル病の診断方法。

13. 遺伝子多型を、RFLP法、PCR-SSCP法、ASOハイブリダイゼーション法、ダイレクトシーケンス法、ARMS法、DGGE法、RNAse A切断法、化学切断法、DPL法、TaqMan PCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、TDI法、一塩基伸長法、WAVE法、一分子蛍光検出法からなる群から選択される一つまたは二つ以上の方法による工程であることを特徴とする、請求項1-12に記載の方法。

14. 以下の(1)~(39)からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む視神経症に関連した遺伝子の検出用キット。

15 (1) EDN1 (エンドセリン1) 遺伝子: コドン番号198位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン1) 遺伝子: 塩基番号1370位がチミンまたはグアニン

20 (3) EDN1 (エンドセリン1) 遺伝子: 塩基番号138位にアデニンが挿入または欠損

(4) EDNRA (エンドセリン受容体A) 遺伝子: 塩基番号70位がシトシンまたはグアニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体A) 遺伝子: 塩基番号1222位がシトシンまたはチミン

25 (6) EDNRA (エンドセリン受容体A) 遺伝子: コドン番号323位のヒスチジ

ンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

(8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシン

5 をコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

(9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

(12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン

10 (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン

(14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン

(15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

15 (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

(17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン

20 (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン

(19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン

(20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

25 (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型

- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190
位がグアニンまたはシトシン
- (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677
- 5 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン
またはアルギニン
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたは
メチオニン
- 10 (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイ
ンまたはセリン
- (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領
域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306
- 15 位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領
域における 5A/6A
- (31) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン
またはグリシン
- 20 (32) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ
シンまたはアルギニン
- (33) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギ
ニンまたはグリシン
- (34) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ
オニンまたはイソロイシン
- 25

- (35) ミオシリン遺伝子：コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- (36) OPTN (オプチニューリン) 遺伝子：塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- 5 (37) SELE (E-セレクトイン) 遺伝子：塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン
- (38) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン
- (39) ミクロソーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン
- 10 15. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項 1.4 記載のキット。
16. さらに視神経症関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 1.4 に記載のキット。
17. 以下の (1) ~ (37) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。
- 15 (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン
- (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 1370 位がチミンまたはグアニン
- 20 (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損
- (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシン
- 25 またはチミン

- (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 231 位がアデニンまたはグアニン
- 5 (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- 10 (12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 713 位がチミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 521 位がシトシンまたはチミン
- 15 (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- 20 (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- 25

- (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$) 遺伝子多型
- (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- 5 (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン またはアルギニン
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたは
- 10 メチオニン
- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイン またはセリン
- (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- 15 (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- (31) B1AR ($\beta 1$ アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン
- 20 またはグリシン
- (32) B1AR ($\beta 1$ アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシン またはアルギニン
- (33) B2AR ($\beta 2$ アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニン またはグリシン
- 25 (34) B2AR ($\beta 2$ アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ

オニンまたはイソロイシン

(35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

(36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(37) SELE (E-セレクトイン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

18. さらに緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 17 に記載のキット。

10 19. 以下の (1)、(2)、(5) ~ (7)、(16)、(19) ~ (22) および (26) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む正常眼圧緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

15 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

(16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

25 (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま

たはシトシン

(20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

(21) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型

5 (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型

(26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: 塩基番号 54 位がロイシンまたはメチオニン

20. さらに正常眼圧緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 19 に記載のキット。

10 21. 以下の (4)、(9) ~ (11)、(14) ~ (15)、(25) および (35) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む高眼圧緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。

(4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

15 (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

(14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン

20 (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

(25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン

(35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

25 シン

22. さらに高眼圧緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項21に記載のキット。
23. 以下の(38)～(39)の遺伝子のプライマーまたはプローブを含むレーベル病に関連した遺伝子の検出用キット。
- 5 (38) TP53 遺伝子：コドン番号72位がアルギニンまたはプロリン
(39) EPHX1 (ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ) 遺伝子：コドン番号113位がチロシンまたはヒスチジン
24. さらにレーベル病に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項23に記載のキット。
- 10 25. 塩基番号9099位がシトシンからアデニンに変異したミトコンドリア遺伝子。
26. 塩基番号9101位がチミンからグアニンに変異したミトコンドリア遺伝子。
27. コドン番号369位がフェニルアラニンからロイシンに変異したアミノ酸をコードするミオシリン遺伝子。
- 15 28. ミオシリン遺伝子に変異を有する対象において、正常および変異のミオシリンをブロックすることを特徴とする緑内障の処置方法。
29. RNAi法によって、正常および変異のミオシリンをブロックすることを特徴とする請求項28に記載の緑内障の処置方法。
- 20 30. 視神経症に関連した遺伝子多型を解析し、解析によって得られた遺伝子型と薬剤に対する反応性、治療効果を結びつけることを特徴とする薬剤感受性の予測方法。
31. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項30に記載の方法。
32. 視神経症が緑内障である請求項30に記載の方法。
- 25 33. アンギオテンシンII受容体2遺伝子の塩基番号2123位がシトシンま

たはアデニンである遺伝子多型ことを解析することを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

34. 薬剤がアンギオテンシン II 受容体拮抗薬である請求項 30 に記載の方法。

ABSTRACT

本発明は、視神経症、特に緑内障およびレーベル病を発症する危険因子を検出可能な危険遺伝子を用いて、視神経症の発症のリスクを判定するための、新規な診断方法および診断のためのキットを提供する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ ~~LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT~~
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

FIG. 1

Yukihiko MASHIMA
METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC
NEUROPATHY
Filing Date: August 27, 2004
Bruce E. Kramer 202-293-7060
1 OF 3

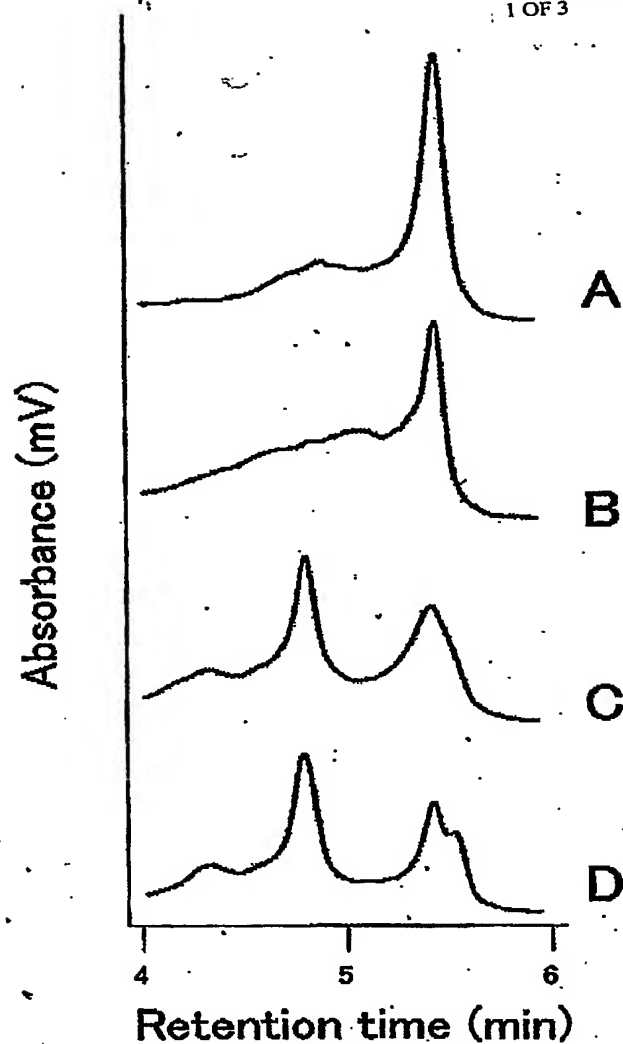


Fig. 2

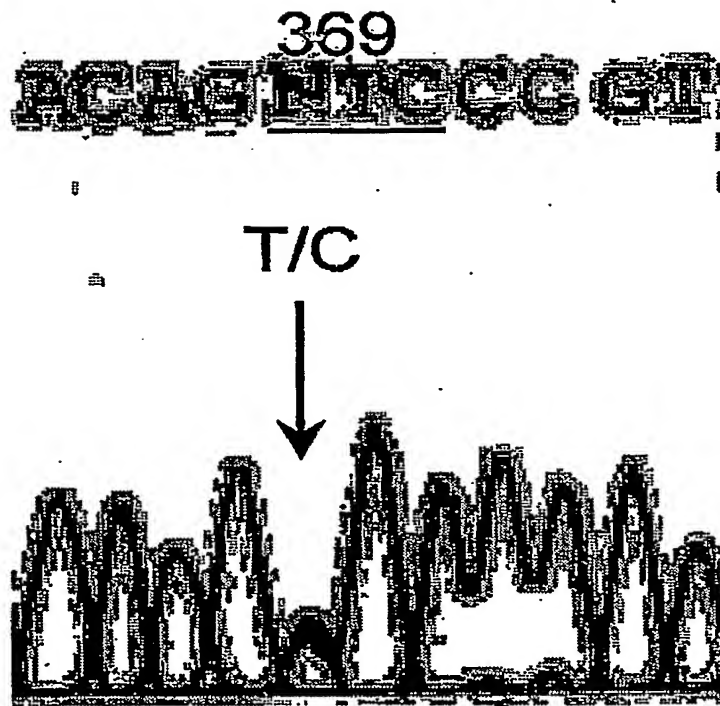


Fig. 3

